

一种经济快速提取丝状真菌基因组 DNA 的方法

陈锋菊, 李百元, 杨冰, 张叶纯

(湖南科技大学 生命科学学院, 中国湖南 湘潭 411201)

摘要: 以螺旋木霉(*Trichoderma Spirale* XX)、小克银汉霉(*Cunninghamella phaeospora* MK)和卵形孢球托霉(*Gongronella butleri* XT) 3种丝状真菌为材料, 采用改进的CTAB法提取基因组DNA。方法改进后无需液氮、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和NaAc等试剂, 过程简洁, 且所需菌体量少, 提取的DNA纯度较好, 适用于一次微量提取多个样品的基因组DNA。此方法得到的基因组DNA可用于PCR扩增。

关键词: 丝状真菌; 基因组DNA; CTAB法; PCR

中图分类号: Q936

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2010)02-0122-03

An Economical and Rapid Extraction Method for Genomic DNA from Filamentous fungi

CHEN Feng-ju, LI Bai-yuan, YANG Bing, ZHANG Ye-chun

(College of Life Sciences, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201, Hunan, China)

Abstract: Genomic DNA of the three filamentous fungi *Trichoderma Spirale* XX, *Cunninghamella phaeospora* MK and *Gongronella butleri* XT were extracted with a modified Cetyltrimethyl Ammonium Bromide (CTAB) method. The improved method does not require liquid nitrogen, PVP and NaAc etc. The process was simple and efficient. The result indicated that higher purity of genomic DNA was obtained with less amount of mycelium by the method which was suitable to treat many samples at one time, and genomic DNA for basic molecular experiments such as PCR.

Key words: filamentous fungi; genomic DNA; CTAB method; PCR

(*Life Science Research*, 2010, 14(2): 122~124)

通常真菌的传统分类鉴定依据主要采用形态学和生理学方面的特征, 但这些方法很易受到培养条件的影响, 如有名的生防真菌-木霉在土豆葡萄糖琼脂培养基(PDA)和玉米葡萄糖琼脂培养基(CMD)上培养时, 其培养特征差异非常显著。而真菌的现代分类鉴定则是结合形态学、生理学以及DNA分子水平等多方面进行综合鉴定。DNA提取是分子水平鉴定的第一步。有关丝状真菌基因组DNA提取的方法有很多^[1-8], 但过程大多较繁琐, 周期长或需加入某些特殊试剂。基

于经济、快速、高效原则, 本研究探索了一种在一般实验室里切实可行的丝状真菌DNA的提取方法。

1 材料与方法

1.1 菌株

螺旋木霉(*Trichoderma Spirale* XX)、小克银汉霉(*Cunninghamella phaeospora* MK)和卵形孢球托霉(*Gongronella butleri* XT)3种丝状真菌均从土壤中筛选得到, 现保存于本实验室。

收稿日期: 2009-10-30; 修回日期: 2010-01-21

基金项目: 湖南省教育厅基金资助项目(B30939)

作者简介: 陈锋菊(1973-), 女, 湖南桑植人, 湖南科技大学讲师, 硕士, 主要从事生物化学与分子生物学研究, E-mail: chenfengju526@163.com.

1.2 试剂

DNA Taq 酶、DNA Marker 200 和 λ DNA/*Hind* III 购自天根生化(北京)科技有限公司,引物由上海生工合成. 其它试剂均为国产分析纯.

1.3 菌体培养与收集

将已分离纯化的3种丝状真菌分别接种于装有40 mL CMD 液体培养基(玉米粉20 g, 葡萄糖20 g, 蒸馏水1000 mL)的100 mL的三角瓶中,置于26~28 °C下摇瓶培养1~2 d后,10 000 r/min 离心5 min 收集菌体,用多层灭菌滤纸将菌体充分吸干.

1.4 基因组DNA的提取

1) 取出事先冷冻的研钵,放置在冰块上,取适量吸干的新鲜菌丝体,加适量的2×CTAB 提取液(含0.7% NaCl, 100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 20 mmol/L EDTA, 20 g/L CTAB), 2~5 μ L β -巯基乙醇和适量的灭菌普通细砂,在研钵中迅速将菌体充分研磨;

2) 研磨后迅速将菌液移入1.5 mL的Eppendorf管中,于65 °C下水浴30 min,水浴过程中颠倒2~3次;

3) 菌液摇匀后加等体积的氯仿:异戊醇混合液(24:1, V/V)充分混匀,4 °C下12 000 r/min 离心5 min;

4) 将上清液移至另一新的Eppendorf管中,加2.5倍体积的冰冻无水乙醇,轻轻摇匀,等沉淀出现后,4 °C下8 000 r/min 离心5 min;

5) 弃上清液,沉淀用70%的酒精洗涤两次,在电烤炉的上方20 cm左右(以不烫手为准)烘干,加50~100 μ L的TE缓冲液(含10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)充分溶解(如果溶解较慢可置于37 °C水浴器中促溶);

6) 加入5 μ L浓度为10 g/L的RNA酶,于65 °C消化40 min;

7) 重复步骤3~5,所提DNA溶液于-20 °C下保存备用.

1.5 DNA质量的紫外检测

按照文献[7]的方法进行DNA浓度和纯度的检测.

1.6 ITS和18S rDNA序列的PCR扩增

ITS序列的PCR扩增采用通用引物^[9]: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). 反应总体积50 μ L, 包括10×PCR缓冲液5 μ L, Mg²⁺(25

mmol/L) 3 μ L, dNTP混合物(10 mmol/L) 1 μ L, ITS1和ITS4(浓度均为25 μ mol/L)各1 μ L, Taq DNA聚合酶0.4 μ L(5 U/ μ L), 模板2 μ L, 无菌水加至50 μ L. PCR反应程序为94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 40 s, 30个循环后再72 °C延伸8 min. PCR产物电泳染色后,用凝胶成像系统拍照.

18S rDNA的PCR扩增采用通用引物对^[10]: NS1(5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3')和NS8(5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3'). 反应总体积50 μ L, 包括10×PCR缓冲液5 μ L, Mg²⁺(25 mmol/L) 3 μ L, dNTP混合物(10 mmol/L) 1 μ L, NS1和NS8(浓度均为25 μ mol/L)各1 μ L, Taq DNA聚合酶0.4 μ L(5 U/ μ L), 模板2 μ L, 无菌水加至50 μ L. PCR反应程序为94 °C 3 min, 94 °C 50 s, 52 °C 1 min, 72 °C 50 s, 30个循环后再72 °C延伸8 min. PCR产物电泳染色后,用凝胶成像系统拍照.

2 结果

2.1 基因组DNA的完整性

取上述方法提取的基因组DNA 5 μ L进行1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,电泳结果显示该方法提取的基因组完整性较好,主条带明显,初步表明本改良方法提取DNA是可行的(图1).

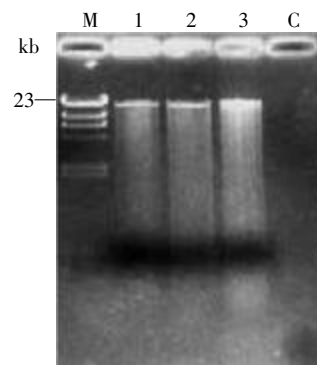


图1 提取真菌的基因组DNA电泳图谱

M、1、2、3和C分别代表 λ DNA/*Hind* III Marker、螺旋木霉XX、小克银汉霉MK、卵形孢球托霉XT和空白对照.

Fig.1 Genomic DNA of three strains of Fungus

M, 1, 2, 3 and C denote λ DNA/*Hind* III Marker, *T. Spirale* XX, *C. phaeospora* MK, *G. butleri* XT and blank control respectively.

2.2 DNA的紫外检测结果

利用紫外分光光度计测定本方法提取的DNA的浓度可达到460~670 mg/L,比传统方法

(仅为 325~390 mg/L)要高得多, 但比张颖慧等^[7]报道的要稍低; 改进后获得的 DNA, UV 检测结果显示, 其 OD_{260}/OD_{280} 比值范围在 1.8~2.0 之间, 说明用本方法提取所得基因组 DNA 的得率较高, 纯度较好.

2.3 DNA 的 PCR 扩增结果

利用真菌 ITS 和 18S rDNA 序列的通用引物对本改良方法提取的 3 种真菌的基因组 DNA 进行 PCR 检测, 结果见图 2. 由图可知, 3 种丝状真菌的 ITS 序列大小约 0.6 kb 左右 (图 2 左), 18S rDNA 序列大小约 1.7 kb 左右 (图 2 右), 条带单一、清晰整齐, PCR 结果良好. 说明该方法提取的基因组 DNA 适合用于 PCR 检测, 可用于一般的分子生物学研究.

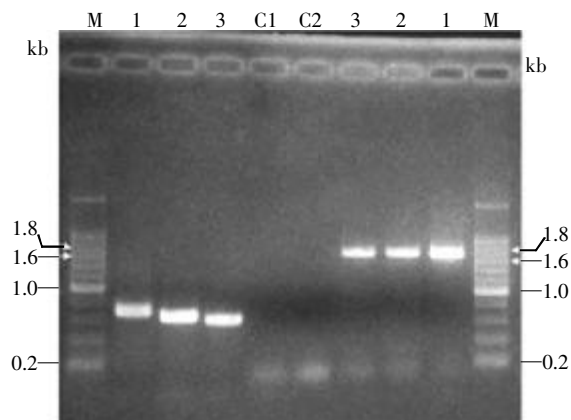


图 2 基因组 DNA PCR 电泳图

左: ITS; 右: 18S Rdna; M、1、2、3 和 C 分别表示 DNA Marker 200、XT、MK、XX 和空白对照.

Fig.2 PCR amplification of ITS (left) and 18S rDNA (right) sequences

M, 1, 2, 3 and C denote DNA Marker 200, XT, MK, XX and blank control respectively.

3 讨论

基因组 DNA 的提取技术是真菌分子鉴定及其相关分子生物学研究中一项最基本的操作技术, 所提取的基因组 DNA 质量的好坏会直接影响后续的实验操作, 如 PCR、酶切和杂交等. 目前, 已报道的真菌 DNA 的提取技术主要采用 SDS、CTAB 或其改良法^[11,12]. 其区别主要在于破壁方法以及破壁后分离核酸、蛋白质方面的不同, 但均包括真菌细胞壁的裂解, 真菌细胞膜的破坏, 达到 DNA 的释放以及真菌的纯化步骤. 传统的破壁包括机械破壁、超声波破壁、玻璃珠

破壁等. 核酸分离包括经典的酚、氯仿抽提, 以及商品化的纯化柱、纯化膜分离法等. 经典的酚、氯仿抽提法涉及到毒性较大的苯酚, 而商品化的试剂盒虽然操作简单、高效, DNA 质量较高, 但价格昂贵, 不太适用于经费较低的一般实验室.

本研究中 DNA 提取法的优点主要是经济、简单, 不需特殊的仪器和药品. 表现在: 不需液氮; 研磨砂采用筛选的普通砂粒; 提取过程中无需苯酚、PVP 和 NaAc 等. 需要注意的事项有: 1) 研钵需进行低温预处理, 研磨时研钵必须置于冰块上, 时间最好严格控制在 2 min 内, 以尽可能地降低 DNA 的降解; 2) 研磨加入的 CTAB 的量随菌丝量的变化而变化. 一般表征是研磨后的匀浆液不宜太粘稠, 以防止加入氯仿/异戊醇抽提时难以分散; 3) 有时, 缓冲液中不加 PVP, 可能会导致最终 DNA 产物比较难溶于 TE 缓冲液, 但这并不影响后续过程, 只需吸取溶解的 DNA 溶液放入新的 Eppendorf 管中, 不会影响 DNA 质量, 但会影响产量; 4) 若加入无水乙醇后沉淀不明显, 可将此 Eppendorf 管于 -20°C 下放置 20 min 促进沉淀; 5) 采用电烤炉烘干时, Eppendorf 管口不宜离火太近, 一般在 20 cm 左右即可, 其最终表征是以闻到乙醇气味为准; 6) 选用的砂粒需过筛使颗粒大小均匀适中, 以便研磨均匀. 事实上, 运用该方法, 本研究室还相继从木霉、毛壳菌、青霉菌和红曲霉中克隆到了蛋白质延伸因子 EF1 和几丁质酶基因, 进一步表明该方法是切实可行的.

致谢: 本研究中的小克银汉霉和卵形孢球托霉的鉴定由中科院微生物所的郑儒永院士完成, 在此表示衷心地感谢!

参考文献 (References):

- [1] JAMES A, HIGGINS M C, JENKINS D R, *et al.* Rapid extraction of DNA from *Escherichia coli* and *cryptosporidium parvum* for use in PCR[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(11): 5321-5324.
- [2] GRIFFIN D W, KELLOGG C A, PEAK K K, *et al.* A rapid and efficient assay for extracting DNA from fungi[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2002, 34(3): 210-213.
- [3] TENDULKAR S R, GUPTA A, CHATTOO B B. A simple protocol for isolation of fungal DNA[J]. *Biotechnology Letters*, 2003, 25: 1941-1944.
- [4] FAGGI E, PINI G, CAMPISI E. Use of magnetic beads to extract fungal DNA[J]. *Mycoses*, 2005, 48(1): 3-7.

(下转第 149 页)